

**РЕСПУБЛИКАНСКОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ КАЗЕННОЕ  
ПРЕДПРИЯТИЕ  
«ЦЕНТР СУДЕБНЫХ ЭКСПЕРТИЗ  
МИНИСТЕРСТВА ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН»**



**МЕТОДИКА**

**УСТАНОВЛЕНИЯ НАЛИЧИЯ СПЕРМЫ НА ВЕЩЕСТВЕННЫХ  
ДОКАЗАТЕЛЬСТВАХ**

**(шифр специальности – 25.1)**

## ПАСПОРТ МЕТОДИКИ

1. Наименование методики	Методика установления наличия спермы на вещественных доказательствах
2. Шифр специальности методики	25.1(3)
3. Информация о разработчике методики	Итбаева Ж.Ж. - судебно-медицинский эксперт высшей квалификационной категории ИСЭ по г.Нур-Султан ЦСЭ МЮ РК, Зайнуллина Р.В. - судебно-медицинский эксперт высшей квалификационной категории ИСЭ по ЗКО ЦСЭ МЮ РК
4. Сущность методики	Обнаружение сперматозоидов либо их головок
4.1. Объекты исследования	Вещественные доказательства
4.2. Методы исследования	Макролюминесцентный, химический, морфологический
4.3. Краткое поэтапное описание методики	Установление наличия спермы различными методами
5. Дата одобрения методики Ученым Советом ЦСЭ МЮ РК	Протокол №1 от 18.06.2020г.
6. Информация о составителях паспорта методики	Итбаева Ж.Ж. - СМЭ высшей квалификационной категории ИСЭ по г. Нур-Султан ЦСЭ МЮ РК

## ОГЛАВЛЕНИЕ

### МЕТОДИКА УСТАНОВЛЕНИЯ НАЛИЧИЯ СПЕРМЫ

Установление наличия спермы с помощью УФЛ.....	4
Установление наличия спермы по кислой фосфотазе.....	4
Установление наличия спермы с применением картофельного сока ..	4
Установление наличия спермы методом Корен - Стокиса (окраска эритрозином).....	5
Установление наличия спермы методом Базки.....	5
Установление наличия спермы методом Серопяна.....	6
Установление наличия спермы методом Джалалова Д. Д.....	6
Установление наличия спермы методом хроматографии.....	6
Установление наличия спермы тестовым реагентом.....	8
Установление наличия семенной жидкости человека с помощью тест пластинок.....	9
Установление наличия крови с помощью тест-полосок .....	10
Перечень использованных источников.....	11

## МЕТОДИКА УСТАНОВЛЕНИЯ НАЛИЧИЯ СПЕРМЫ

### Установление наличия спермы с помощью УФЛ

Пятна спермы в УФЛ имеют бледно-голубое свечение.

Исследование проводят в затемненной комнате с применением ртутно-кварцевой лампы (типа ОЛД - 41), подозрительные участки обшивают нитками и маркируют;

### Установление наличия спермы по кислой фосфатазе

Вырезки размером 0,3 x 0,3 см из пятен, заведомых образцов выделений, спермы, крови, предметов - носителей заливали ацетатным буфером по 3 – 4 капли в лунках на 10 минут. Затем в каждую лунку добавляли по 1 капле проявителя.

### Учет результатов

В кусочках с заведомым образцом спермы и в объектах при положительном результате наблюдают кирпично-красное окрашивание.

При отрицательном результате в препаратах окрашивания не наблюдают. Время наблюдения в течение 30 секунд.

### Установление наличия спермы с применением картофельного сока

Реакция основана на содержании в клубнях картофеля витамина С, который вступает во взаимодействие с половыми гормонами, в силу чего утрачивает способность агглютинировать эритроциты (задержка агглютинации)

### Постановка реакции:

1. Клубень картофеля моют, очищают от загрязнений, промывают в воде и растворе хлористого натрия.

2. Измельчают на терке. Полученную массу помещают на марлю, отжимают сок в пробирку, фильтруют. В таком виде может храниться 2—3 дня.

3. Затем сок титруют. Титр должен быть 1 : 32. Для этого 1 часть сока смешивают с 50 частями физиологического раствора и титруют.

4. К 2 каплям сока из каждого разведения добавляют 1 каплю 1% взвеси однократно отмытых эритроцитов группы О. Центрифугируют 10 минут при 2500—3000 об/мин.

5. Наибольшее разведение сока, в котором видна агглютинация при микроскопическом исследовании, является показателем его титра.

6. Кусочки 0,5x0,5 см до 1x1 см исследуемого материала и равные кусочки контрольных участков, кусочки заведомо известной спермы, мочи крови заливают физиологическим раствором.

7. Экстрагирование 20—24 часа при T+4°C.

8. Полученную вытяжку центрифугируют.

9. К 1 капле вытяжки добавляют 1 каплю картофельного сока в титре 1 : 32 и 1 каплю 1 % взвеси однократно отмытых эритроцитов группы О.

10. Для контроля 1 каплю сока картофеля в рабочем разведении смешивают с 1 каплей взвеси тех же эритроцитов.

11. Пробирки центрифугируют 10 минут при 2500—3000 об/мин и



энергично встряхивают в штативе.

#### **Учет результатов**

12. Результаты учитывают макро- и микроскопически.

13. За положительный результат считают полную задержку(отсутствие) агглютинации, или частичную, но значительную ее задержку, при наличии в контрольных пробирках агглютинации, различимой невооруженным глазом.

#### **Установление наличия спермы методом Корен -Стокиса (окраска эритрозином)**

1.Кусочек материи, вырезанный из пятна, кладут на предметное стекло.

2.Наносят 2-3 капли 0,5% раствора эритрозина (на 100 мл 25% аммиака 0,5 грэритрозина).

3. Расщепляют, накрывают покровным стеклом, микроскопируют.

Старые пятна спермы перед окрашиванием рекомендуется длительное время размачивать в аммиаке (3—25%) или слабом растворе щелочи.

#### **Установление наличия спермы методом Базки**

**Используют одну из трех красок:**

1. 1 мл 1% раствора кислого фуксина на 40 мл 1% раствора соляной кислоты.

2. 1 мл 1% раствора метиленовой синьки на 40 мл 1% раствора соляной кислоты.

3. 1 мл 1% кислого фуксина и 1 мл 1% раствора метиленовой синьки на 40 мл 1 % раствора соляной кислоты.

#### **Принципы реакции**

1. Кусочки исследуемого пятна или вытяжку помещают в 1 каплю одного из приведенных растворов.

2 . Через 1 минуту их промывают в 1% растворе соляной кислоты на стекле.

3.После высушивания на воздухе просветляют в ксилоле и заключают в канадский бальзам.

#### **Учет результатов**

3. Микроскопируют. При окраске первым раствором сперматозойды окрашиваются в красный цвет, вторым - в синий, третьим - головки в красный цвет, а хвостики в синий.

#### **Установление наличия спермы методом Серопяна**

1.Из пятна вырезают кусочек 1см<sup>2</sup>, разволокняют .

2.Расщепленный материал переносят в пробирки и заливают 10% раствором аммиака на 18—24 часа при T+4°C.

3.Затем пробирки центрифугируют 4—5 минут при малом количестве оборотов центрифуги.

4.Надосадочную жидкость удаляют.

5.Осадок помещают на предметные стекла, окрашивают аммиачным раствором эритрозина, микроскопируют.

#### **Установление наличия спермы методом ДжалаловаД. Д.**

1. Из исследуемого пятна вырезать ниточку и погрузить ее в 0,25% раствор эритрозина в 2% растворе щелочи.

2.Волокно помещают на отдельную рентгеновскую пленку и сверху покрывают такой же.

3 Пленки сдавливаются между пальцами.

4. Затем разъединяются и микроскопируются.

#### **Установление наличия спермы методом хроматографии**

Одновременное выявление холина, спермина, кислой фосфатазы и аминокислот при помощи восходящей хроматографии на бумаге позволяет установить наличие спермы в пятне независимо от присутствия в ней сперматозоидов. Это дает возможность использовать метод даже при азооспермии, олигозооспермии, когда морфологическое исследование безрезультатно.

Метод чувствителен. Пятна, образованные 0,0025 мл спермы давали отчетливую хроматограмму всех компонентов. Давность около 2 лет не влияла на результат.

Специфичность метода проверена путем исследования пятен слюны, выделений из носа, слез, пота, секрета влагалища, женского молока, крови и мокроты, гноя, объектов растительного происхождения соков овощей, фруктов, ягод, листьев и других частей растений. На хроматограммах некоторых из этих веществ проявлялись аминокислоты и даже кислая фосфатаза, но холин, спермин, а тем более все 4 компонента одновременно не обнаруживались.

Различные предметы-носители не препятствовали выявлению спермы.

#### **Подготовка камер.**

а) *Для проведения хроматографии.* В верхней части камеры, ближе к правой и левой стенкам, устанавливаются мостик две стеклянные палочки (трубки), длина которых на несколько миллиметров меньше расстояния между внутренними стенками камеры. Палочки укрепляют как распорки, подложив под их торцы пробки от пенициллиновых флаконов.

В делительную воронку наливают систему растворителей - бутанол, уксусную кислоту и воду. Взбалтывают 2-3 раза и оставляют до следующего дня. Смесь разделяется на 2 слоя.

Нижний (водный) слой сливают в химические стаканы и ставят их в камеру, к задней стенке, чтобы не мешали подвешиванию листов бумаги. Верхний накрывают крышкой - куском стекла.

б) *Для проявления хроматограмм.* Крышку для этой камеры делают из двух частей. Взяв кусок стекла такой величины, чтобы он выступал примерно на 1 см за края камеры, отрезают стеклорезом четвертую часть. Большой кусок (3/4) кладут на ровную поверхность и ставят в него камеру вверх дном. По ходу соприкосновения стекла с краями камеры пипеткой наносят клей (канцелярский или «БФ»). После полного высыхания клея, банку переворачивают в

нормальное положение. Меньший кусок стекла (1/4), который не приклеивали, служит подвижной частью крышки и одновременно используется для удерживания хроматограмм. Перед зарядкой камеры смазывают вазелином его края для герметизации. На дно камеры помещают осадок проявителя для холина и спермина и закрывают крышку. Если камеру не



оставлять открытой то ею можно пользоваться длительное время, пока черный осадок не обесцветится.

Приступая к проявлению, подвижную часть крышки слегка отодвигают и через образовавшуюся щель опускают в камеру хроматограмму, держа ее за верхний конец. Затем задвигают;стекло, зажимая лист бумаги между подвижной и неподвижной частями крышки.

#### Подготовка материала

А) Изисследуемых пятен, контрольных участков предметов-носителей и заведомого пятна спермы (заготавливается заблаговременно, лучше - на хроматографической бумаге) делают вырезки округлой формы, диаметром 0,6 см.

Захватив вырезку маленьким пинцетом, увлажняют ее в капле 1% раствора фенолфталеинфосфата натрия и переносят на капиллярный мостик, установленный в чашке Петри. Чашку Петри с объектами исследования помещают в термостат при 37°C на 1 час.

Высушенные вырезки вставляют в надрезы, сделанные на хроматографической бумаге, у стартовой линии. На каждом листе, кроме вырезок из пятен и предметов носителей, должна быть одна вырезка из заведомого пятна спермы. Конец листа, противоположный линии старта и вставленным вырезкам, закрепляют в бумагодержателе.

Б) Если след, подозрительный на сперму, расположен на твердом предмете, то его соскабливают на предметное стекло с лункой и заливают 1-2 каплями дистиллированной воды. Захватив пинцетом кусочек хроматографической бумаги 0,6 x 1,2 см величиной, погружают его в вытяжку; увлажненный кусочек высушивают в струе теплого воздуха (над электрической плиткой) опять погружают в вытяжку и вновь высушивают, до полного переноса вытяжки на бумагу. После этого кусочек складывают пополам, вставляют в надрез на листе хроматографическойбумаги и исследуют так же, как и вырезки из пятен.

#### Исследование

Бумагодержатели с подготовленными листами бумаги кладут на мостик. Нижний конец гнета должен слегка погружаться в налитый на дно камеры растворитель, а вырезки должны быть на 1-1,5 см выше уровня растворителя. Камеру накрывают крышкой, смазав края вазелином.

Когда поднимающийся по бумаге растворитель подойдет близко к верхнему краю листа, лист вынимают и, отметив простым карандашом линию фронта растворителя, высушивают при комнатной температуре.

#### ***Проявление холина и спермина***

Высохшую хроматограмму помещают на несколько секунд в камеру, насыщенную парами проявителя. При наличии в объекте исследования спермина, у стартовой линии появляется зона желтовато-бурого цвета ( $R_f$  0,03-0,07), выше нее выявляется зона холина коричневатого-красного цвета ( $R_f$  0.18-0,22).

#### ***Проявление аминокислот***

После исчезновения окраски зон холина и спермина хроматограмму опрыскивают 0,1% раствором нингидрина в хлороформе и помещают в

сушильный шкаф (5 минут при 105°C). При этом на полосах обнаруживаются аминокислоты в виде цепочки из 6-10 фиолетово-синих или фиолетово-коричневых пятен. Наиболее часто это - цистеин, лизин, серин, аспарагиновая кислота, метионин и лейцин (что, в случае надобности можно установить при помощи метчиков).

#### **Проявление кислой фосфатазы**

После выявления аминокислот, верхнюю часть хроматограммы опрыскивают 0,1% раствором едкого натра. При наличии в пятне кислой фосфатазы, вблизи линии фронта фенолфталеина в виде розово-красной зоны ( $R_f$  0,92-0,94).

#### **Определение $R_f$**

Помимо визуального учета образовавшихся зон, устанавливают их  $R_f$ .  $R_f$  - это отношение перемещения зоны к фронту растворителя. Например, расстояние от линии старта до части обнаруженного пятна холина 50 мм, а расстояние от линии старта до фронта растворителя 200 мм. Величина  $R_f$  равна  $50:200=0,25$ .

#### **Оценка результатов**

Положительные результаты комплексного определения спермина, холина, кислой фосфатазы и аминокислот достоверно указывают на наличие спермы в исследуемом объекте. Выявление аминокислот является дополнительным признаком, так как они содержатся не только в сперме. Зоны аминокислот заведомого пятна спермы и исследуемых объектов, содержащих сперму, могут не совпадать: это зависит от индивидуальных свойств мужчины, давности пятна и др.

#### **Установление наличия спермы тестовым реагентом**

##### **Введение**

Кислая фосфатаза — фермент, вырабатываемый в организме в основном предстательной железой и содержится в эякуляте в очень большом количестве, значительно превышающем содержание ее в других секретах и жидкостях человеческого организма.

Он, как и PSA (простатический специфический антиген), не уникален для простаты и может быть найден в других биологических жидкостях, включая выделения из влагалища, поэтому считается предполагаемым химическим тестом на наличие спермы и должны быть подтверждены другими средствами (обнаружение спермы или определение ПСА с использованием мембранного тест-системы).

Тестирование на присутствие кислой фосфатазы может быть чрезвычайно полезным, при обнаружении пятен спермы на одежде и для тестирования тампонов в случаях сексуального насилия.

Положительная реакция обычно указывает на наличие спермы и дальнейшее тестирование является оправданным.

Ферментативное разрушение натрий- $\alpha$ -нафтилфосфата кислотой фосфатазы и последующей конверсии о-динанизидин в окрашенное соединение посредством свободный нафтил является признанной процедурой для определения спермы.

#### **Принцип метода**



Кислотная фосфатаза (AP) представляет собой фермент, который содержится в семенной жидкости, компонент спермы. Его концентрация в семенной жидкости до 400 раз больше, чем в других биологических жидкостях.

Натрий -нафтилфосфат расщепляется кислотной фосфатазой в образце, происходит высвобождение фосфата натрия и нафтола. Нафтол в паре с брантамином (о-динанизидин) создает фиолетовый азокраситель.

Формирование фиолетового цвета указывает на присутствие кислой фосфатазы, т.е. спермы.

### **Материалы**

В этой процедуре используются следующие принадлежности:

- фильтровальная бумага
- ватные палочки
- стеклянные пластины

### **Реактивы**

**следующие реагенты для определения наличия спермы:**

1. Реагент для теста AP SpotTest
2. Растворить 0,26 г пробирного теста SERI AcidPhosphataseSpotTest в 10 мл деионизированной воды. Раствор должен быть каждый раз свежим перед использованием.

### **Постановка реакции для спермы:**

1.Смочите фильтровальную бумагу подходящего размера с деионизированной водой.

2.Положите фильтровальную бумагу поверх подозрительного пятна, чтобы перенести ее на фильтровальную бумагу.

Для обеспечения надлежащего применения можно использовать стеклянную или пластиковую пластину и массу контакта.

3.Отметьте швы или другие ориентиры для ориентации.

4.После удаления фильтровальной бумаги из элемента доказательства примените AP Spot тестовый реагент до тех пор, пока фильтровальная бумага не будет насыщена.

5. Запишите развитие любого цвета, который происходит в течение 60 секунд

### **Учет результатов для кислотной фосфатазы:**

Развитие фиолетового цвета в течение 60 секунд является положительным (+) результатом для присутствия кислой фосфатазы (при определении спермы) .

Отсутствие цветовой реакции в течение 60 секунд является отрицательным (-) результатом для наличия кислой фосфатазы (при определении спермы).

Кислотная фосфатаза присутствует в семенной жидкости компоненте спермы в высокой концентрации; однако она также присутствует в других жидкостях организма при более низких концентрациях и растений, грибов и бактерий. Семенные пятна имеют тенденцию давать быстрее и сильнее, чем другие источники.

Поскольку кислотная фосфатаза не уникальна для семенной жидкости, тест является только презумптивным тестом на наличие семенной жидкости.

Отрицательная реакция не обязательно означает, что кислотная фосфатаза или других компонентов спермы нет. Дальнейшее тестирование на присутствие сперматозоидов необходимо провести на простатоспецифический антиген либо семиногелин.

#### **Вывод**

Тестирование **кислой фосфатазы и серина** остается ценным исследованием для скрининга тампонов, изъятых у пострадавших от сексуального насилия, и для тестирования различных пятен, обнаруженных на одежде и постельных принадлежностях.

Все пятна, которые флуоресцируют не обязательно сперма, и не все пятна спермы флуоресцируют. К тому же, сперма представляет собой гетерогенную жидкость, и части осажденного пятна будут содержать различные уровни кислой фосфатазы и сперматозоидов.

Реакция на кислую фосфатазу является недорогой и быстрым методом для скрининга подозрительных на сперму пятен.

#### **Установление наличия семенной жидкости человека с помощью тест пластинок**

Реакция основана на содержании простатоспецифического антигена или семеногелина (белок вырабатываемый семенными пузырьками, определяет степень густоты семенной жидкости после эякуляции) в спермальной жидкостичеловека, который взаимодействуя с моноклональными антителами мыши образует комплекс антиген-антитело, мигрирующего с током жидкости до тестовой линии.

##### **Постановка реакции:**

1. Вырезки из объектов для экспертизы (площадью около 20мм) инкубируют в 100мкл универсального буфера в течение 1-2 часов при комнатной температуре.
2. Отобрать 10мкл полученного экстракта и смешать с 90мкл универсального буфера.
3. Полученный объем-100мкл вносят в углубление теста.
4. Оценка результата в течение 10минут

##### **Учет результатов:**

Учет результатов визуальный. Наличие двух либо трех красных полос (в зависимости от производителя тестов) в контрольной (С) и тестовой зоне (Т) свидетельствует о положительном результате-наличии спермальной жидкости человека, появление только одной видимой красной полосы в контрольной зоне (С) свидетельствует об отрицательном результате.

#### **Установление наличия крови с помощью тест-полосок**

##### **Постановка реакции:**

Кусочки из пятен, предметов-носителей заливаются физиологическим раствором на 20-48 часов, экстрагирование проводится в условиях комнатного холодильника.

Вытяжки по 1 капле из каждого объекта исследования наносятся на соответствующий индикатор

результат учитывается в течение 60 секунд

#### **Учет результатов**

Учет результатов визуальный. При положительном результате на крайней индикаторной зоне полоски отмечается окрашивание от светло фиолетового до интенсивно фиолетового цвета. При отрицательном результате цвет не изменяется.

#### **Перечень использованных источников:**

1. Сборник материалов по судебно- медицинской экспертизе. -М.,1960.
2. «Инструкция по организации и производству судебно-медицинской экспертизы» (Приказ МЗ РК от 20 мая 2010г. № 368) – Астана, 2010
3. Информационное письмо Главного судебно-медицинского эксперта Минздрава СССР. О методах установления наличия выделений при исследовании вещественных доказательств. Алматы 1982г.
4. Gaensslen RE. Справочник по судебной серологии, иммунологии и биохимия , Исследовательский фонд Городского университета Нью-Йорка, 1983.
5. Babson AL, Read P и Phillips G. Важность субстрата в анализах кислотная фосфатаза в сыворотке, Американский журнал клинической патологии, 32 (1), июль 1959, стр. 1-5.
6. Sensabaugh GF. Количественный тест на кислотную фосфатазу. Статистический анализ эндогенных и посткоитальных кислот фосфатазы во влагалище, журнал Судебные науки, 24 (2), апрель 1979 г., стр. 346-365
7. Шифф AF. Надежность теста кислотной фосфатазы для идентификации семенной жидкости, JournalofForensicSciences, 23 (4), October 1978, pp. 833-843.
- 8.Методика установления наличия спермыс помощью тест-пластинки «SERATECPSASEMIQUANT» – Астана, 2016г.
- 9.Инструкция по применению тест полосок «RSIDSEMEN»